

氮源和真菌诱导子对铁皮石斛原球茎悬浮培养的影响*

宋经元, 郭顺星**, 肖培根

(中国医学科学院·中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 利用正交实验设计研究不同种类和浓度的氮源对铁皮石斛原球茎生长的影响, 利用完全随机实验设计研究不同真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长和多糖积累的影响。结果表明硝态氮促进铁皮石斛原球茎鲜重和干重的增加 ($P < 0.05$); 铵态氮促进铁皮石斛原球茎鲜重增加 ($P < 0.05$)。无论鲜重还是干重, 硝态氮和铵态氮的影响均不存在互作, 最佳组合为: 67-V 培养液 + 100 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 800 mg/L KNO_3 + 30 g/L 蔗糖 + 200 g/L 马铃薯提取汁。F 检验的结果表明, 14 种真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生物量的增加(鲜重与干重) 均无显著性影响 ($P > 0.05$)。但与对照铁皮石斛原球茎的多糖含量相比, 真菌诱导子 g6、g14、g5、g4 处理可使其多糖含量分别提高 14%、9%、6%、4%。本研究获得了有利于铁皮石斛原球茎生长的硝态氮和铵态氮的最佳搭配方案以及有利于铁皮石斛原球茎积累多糖的四种真菌诱导子, 表明通过液体悬浮培养生产铁皮石斛原球茎及其多糖成分具有较好的开发应用前景。

关键词: 正交实验设计; 完全随机实验设计; 铁皮石斛; 生物量; 多糖积累

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253 - 2700 (2008) 01 - 105 - 05

Effects of Nitrogen Source and Fungal Elicitors on Biomass and Polysaccharide Accumulation in Suspension Cultured Protocorms of *Dendrobium candidum* (Orchidaceae)

SONG Jing-Yuan, GUO Shun-Xing**, XIAO Pei-Gen

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: Biotic and abiotic elicitors have dramatically promoted the accumulation of secondary metabolites in plant cell cultures. In this paper, through the orthogonal design and the randomized complete experimental design, we have investigated effects of nitrate source and fungal elicitors on growth and polysaccharide accumulation in suspension cultured protocorms of *Dendrobium candidum*. It has been found that nitrate (KNO_3) promoted propagation of *D. candidum* protocorms in suspension culture, fresh weight and dry weight of protocorms increased significantly ($P < 0.05$). However, ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) only stimulated significant increase of fresh weight of protocorms ($P < 0.05$), nitrate and ammonium were not interrelated for biomass of protocorms. The results demonstrate that 67-V medium supplemented with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mg/L, KNO_3 800 mg/L, sucrose 30 g/L and potato extract 200 g/L was best for the growth of protocorms. In addition, fourteen fungal elicitors did not significantly influence biomass of suspension cultured protocorms of *D. candidum* ($P > 0.05$). However, compared with the content of polysaccharides in the control, the one in the protocorms of *D. candidum* elicited by fungi g6, g14, g5 and g4 raised 14%, 9%, 6% and 4%, respectively. Since *D. candidum* is a rare medicinal plant and polysaccharides are important active components in the plant, our results show good application prospect for producing protocorms of *D. candidum* in suspension culture.

Key words: Orthogonal design; Randomized complete experimental design; *Dendrobium candidum*; Biomass; Polysaccharide accumulation

* 基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (30325047); 北京市科技新星计划 (2003A61)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: sxguo2006@yahoo.com.cn; Tel: 010 - 62829619

收稿日期: 2007-05-19, 2007-07-29 接受发表

作者简介: 宋经元 (1969-) 男, 副研究员, 主要从事植物次生代谢的相关研究。

铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.) 是我国重要的药用植物之一, 用其加工的产品“铁皮枫斗晶”在国内外市场深受欢迎, 由于铁皮石斛生活环境特殊和自身繁殖困难, 使得其产量低、生长区域小、野生资源极其有限, 目前铁皮石斛已被列为濒危物种。通过细胞工程技术生产铁皮石斛原球茎是解决铁皮石斛资源紧缺、栽培困难等问题的有效途径, 我们已经报道了不同基本培养基对铁皮石斛原球茎生长的作用, 并研究了接种量与培养液体积对铁皮石斛原球茎生长的作用(宋经元等, 2004)。郁美娟等(2003)报道多糖类成分是石斛中具有免疫增强作用和抗肿瘤作用的活性成分, 常以多糖的含量高低来判断某一石斛类药材质量的好坏。由于生物和非生物因子(刘晓琴等, 2006; 赵春芳等, 2006)在植物细胞培养生产次生产物时具有重要的调控作用, 特别是真菌诱导子往往可以大幅度提高次生产物的含量, 因而已获得广泛应用(Pitta-Alvarez 等, 2000; Khosroushahi 等, 2006; Conceicao 等, 2006), 并已深入到其作用机理的研究(Alexander 等, 1996; Sanchez-Sampedro 等, 2007)。本文进一步研究氮源和真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长和多糖积累的影响, 为通过液体培养大量生产铁皮石斛原球茎以及研究真菌诱导子的作用机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.) 原球茎于 1/2MS (大量元素减半, 以下同此) + 30 g/L 蔗糖 + 200 g/L 马铃薯提取汁的固体培养基上培养 30 d 继代或用作实验材料。

1.2 真菌材料

真菌菌种保存于(0~4)冰箱, 于试管斜面上的原始菌种共 14 种, 均分离自兰科药用植物体内, 编号 g1~g15 (缺 g12)。

1.3 试剂

基本培养液: 67-V 培养液(已含 100 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 800 mg/L KNO_3) + 30 g/L 蔗糖 + 200 g/L 马铃薯提取汁, KNO_3 (分析纯), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (分析纯)。真菌诱导子实验中采用的培养基为基本培养液 + 100 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 800 mg/L KNO_3 。麦麸培养基成分: 麦麸 50 g/L 煮沸 30 min, 四层纱布过滤取滤液 + MgSO_4 1.5 g/L + D-葡萄糖 20.0 g/L + KH_2PO_4 3.0 g/L (条形琼脂 12~15 g/L)。

1.4 不同氮源影响的研究方法

以 67-V + 30 g/L 蔗糖 + 200 g/L 马铃薯提取汁为基本培养液, 利用正交设计研究硝态氮(KNO_3)和铵态氮($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)两因素对原球茎生长的影响。每因素各取四个水平(表 1, 考虑两因素的交互作用)。选正交表 L₁₆(4⁵)安排实验, 因为考虑没有空列作误差估计, 应作重复试验。为避免系统误差, 做 1~16 号签两份, 当实验计划编订后, 用抽签办法确定实验顺序, 实验方案见表 1。采用 250 ml 三角瓶, 每瓶加 50 ml 培养基, 平均接种量: 2.547 mg/flask。培养条件: (24 ± 1)℃, 漫射光下, 摆床转速 120 r/min。培养 30 d 收获, 用吸水纸吸干培养物表面水分, 称取鲜重, 晾干, 称干重, 计算极差 R 及 K 值, 确定主要因子列及最佳组合, 并采用 F 检验进行统计分析, 如果差异显著或极显著, 则进一步采用 q 检验。

表 1 实验方案和结果
Table 1 Experimental scheme and results

处理编号 Treatment No.	A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mg/L)	B: KNO_3 (mg/L)	鲜重 Fresh weight		干重 Dry weight	
			I (g/flask)	II (g/flask)	I (g/flask)	II (g/flask)
1	0	0	5.895	8.709	0.818	0.953
2	100	200	8.845	13.106	1.059	1.360
3	200	400	10.876	10.510	1.198	1.179
4	300	800	11.373	13.057	1.161	1.233
5	200	800	11.254	13.825	1.248	1.262
6	300	400	9.042	12.034	1.050	1.318
7	0	200	7.129	10.445	0.943	1.194
8	100	0	5.489	13.334	0.750	1.284
9	300	200	11.440	8.475	1.177	1.068
10	200	0	8.341	6.989	0.994	0.881
11	100	800	12.354	14.976	1.331	1.443
12	0	400	7.270	7.386	1.021	0.962
13	100	400	13.035	12.338	1.256	1.211
14	0	800	8.406	8.415	1.050	1.082
15	300	0	5.613	10.011	0.711	1.168
16	200	200	10.590	11.384	1.146	1.257

(Newman-Keuls 检验) 找出主要影响因素和最佳处理, 结果以“均值±标准差”表示。统计分析参考文献(徐吉民, 1987; 南京农业大学, 1989; 李春喜等, 1997)。

1.5 真菌诱导子的制备

原始菌种 转接到含麦麸培养基的平皿中 24 h, 暗培养 10~15 d 转至含麦麸培养基的液体培养基中(250 ml 培养液/500 ml 三角瓶, 每个菌种接 2 个 500 ml 三角瓶) 24 h, 暗培养 10 d 左右 收获, 培养液与培养物一起匀浆, 每个菌种分装 2 个 500 ml 三角瓶, 121 °C 灭菌 30 min 置室内(20 °C 左右) 阴凉干净处备用。

1.6 真菌诱导子影响的研究方法

采用 250 ml 三角瓶, 每瓶加入 100 ml 培养液, 100 ml 培养液中含 10 ml 真菌诱导子作为处理, 不含的作为对照, 共 14 个处理加 1 个对照。平均接种量 7.5 g/flask。重复 3 次, 完全随机实验设计。在 120 r/min 摆床上, (24 ± 1), 漫射光下培养 30 d 收获, 称鲜重、干重。采用 F 检验进行统计分析, 结果以“均值±标准差”表示。

1.7 铁皮石斛原球茎多糖含量的分析

将所有干样品分别用研钵磨碎, 混匀, 每种处理的样品称 5.0 g, 用于测定多糖含量, 采用苯酚法(李满飞等, 1990)。

2 结果

2.1 不同氮源对铁皮石斛原球茎生长的影响

收获时各处理的表观性状如下: 处理 1、15、16 浅绿色、淡黄色、生长良好, 组织块较致密, 无分化; 处理 2、3、6、7、8、9、10、12、14 淡黄色, 少量绿色, 组织块较致密, 无分化; 处理 4、5、11、13 黄白色, 浅绿色, 组织块较致密, 无分化。该结果表明不同氮源对原球茎分化和组织致密程度没有影响, 但对原球茎生长和颜色有较明显影响。

收获时各处理的鲜重和干重见表 2, I、II 为 2 个重复。不同浓度的硝态氮(以 KNO₃ 作代表)和铵态氮(以 (NH₄)₂SO₄ 作代表)对铁皮石斛

表 2 铵态氮对铁皮石斛原球茎生长的影响

Table 2 Effect of ammonium on protocorm growth
of *Dendrobium candidum*

(NH ₄) ₂ SO ₄ (mg/L)	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)
300	10.131 ± 2.384	1.111 ± 0.183
200	10.471 ± 2.054	1.146 ± 0.138
100	11.685 ± 3.041 *	1.212 ± 0.218
0	7.957 ± 1.358	1.003 ± 0.112

n = 8, $\bar{x} \pm s$, q test, * P < 0.05 compared with treatment 0

原球茎鲜重、干重影响的极差分析、F 检验及多重比较(q 测验)的结果如下:

对鲜重进行极差分析的结果为: R_A/Re = 3.1, R_B/Re = 3.0, R_{AXB}/Re = 0.8; 对干重进行极差分析的结果为: R_A/Re = 2.5, R_B/Re = 3.4, R_{AXB}/Re = 0.5。无论鲜重还是干重, 极差分析表明: 硝态氮和铵态氮均为主要影响因素, 二者不存在互作。故不考虑互作, 最有利于鲜重和干重增加的处理组合均为 100 mg/L (NH₄)₂SO₄ + 800 mg/L KNO₃(即 A₂B₄)。

对鲜重和干重进行 F 检验及多重比较(q 测验)的结果表明(表 2、表 3), 对于鲜重, 硝态氮和铵态氮均具有显著性影响, 二者不存在互作, 最佳组合为: 100 mg/L (NH₄)₂SO₄ + 800 mg/L KNO₃(即 A₂B₄); 对于干重, 硝态氮具有显著性影响, 铵态氮具有较明显的影响, 二者不存在互作, 最佳组合为: 100 mg/L (NH₄)₂SO₄ + 800 mg/L KNO₃(即 A₂B₄)。

故 F 检验与极差分析的结果完全一致, 综合对干鲜重的影响, 选取的最佳处理组合为: 100 mg/L (NH₄)₂SO₄ + 800 mg/L KNO₃(即 A₂B₄)。

2.2 真菌诱导子的获得

获得 14 种真菌的匀浆制备液, 各匀浆液表观性状如下: g1、g3、g4、g6、g15, 菌丝碎片与液体分层明显, 浅黄色; g2, 菌丝碎片与液体分层明显, 红棕色; g5、g7, 菌丝碎片与液体分层不明显, 白色; g8, 菌丝碎片与液体分层一般, 白色; g9、g10、g11, 菌丝碎片与液体分层明显, 浅红棕色; g13, 菌丝碎片与液体分层一般, 黄色; g14, 菌丝碎片与液体分层一般, 浅灰色。上述结果表明 14 种真菌经发酵后获得的匀浆液在颜色和分层特性等表观性状方面具有多样性。

表 3 硝态氮对铁皮石斛原球茎生长的影响

Table 3 Effect of nitrate on protocorm growth
of *Dendrobium candidum*

KNO ₃ (mg/L)	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)
800	11.708 ± 2.374 *	1.226 ± 0.129 *
400	10.311 ± 2.213	1.149 ± 0.124 *
200	10.177 ± 1.921	1.151 ± 0.129 *
0	8.048 ± 2.687	0.945 ± 0.200

n = 8, $\bar{x} \pm s$, q test, * P < 0.05 compared with treatment 0

2.3 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响

14种真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响见图1和图2, *F*检验的结果表明, 14种真菌诱导子对原球茎生物量的增加(鲜重与干重)均无显著性影响($P > 0.05$)。无论鲜重还是干重, 收获量排在前三位的是: 对照(CK)、g4号真菌、g11号真菌。与对照(CK)相比, 所有真菌诱导子对原球茎的生长均表现了不同程度的抑制作用。

2.4 铁皮石斛原球茎多糖含量的分析

真菌诱导子对铁皮石斛样品多糖含量的影响见图3。结果表明, g6处理的铁皮石斛原球茎的多糖含量最高, 约12.0%, g14、g5处理的铁皮石斛原球茎的多糖含量分别为11.4%、11.1%, 高于CK(10.5%), g4处理的铁皮石斛原球茎的多糖含量(10.9%)则与CK相当, 其它样品的多糖含量均低于CK, 其中g2处理的铁皮石斛原球茎的多糖含量最低, g11处理的铁皮石斛原球茎的多糖含量次低。

3 讨论

硝态氮和铵态氮不同浓度对植物细胞、组织和器官生长、分化的影响, 在许多植物上均有报道, 但对于石斛属植物, 仅见Lim等(1992)报道光强、糖和CO₂浓度对生长在琼脂培养基上石斛小植株硝态氮和铵态氮吸收、生长、光合作用活性的影响: 优先吸收铵态氮超过硝态氮, 硝态氮的吸收相对较少, 随光照增加其吸收量增加, 培养基中有糖时其吸收也增加, 铵态氮吸收也受光影响, 而铵态氮和硝态氮吸收的比率变动不大。当培养基中存在糖时小植株的鲜重增加, 但其相对生长率则有所下降, CO₂浓度的增加不影响氮的吸收和植株的生长。在培养中小植株的营养供应主要是异养的。以前兰科植物的原球茎和小植株也有类似报道(Hew等, 1988; Hew and Lim, 1989)。石斛是自然界中的附生兰, 森林中石斛茎的化学成分分析表明铵态氮是硝态氮的40倍(Benzing, 1989)。兰根优先吸收铵态氮可以使石斛充分利用在矿质少的附生生活环境中的营养。

但是, 在本文的研究中发现铁皮石斛原球茎需要硝态氮的浓度比铵态氮的浓度大, 可能由于

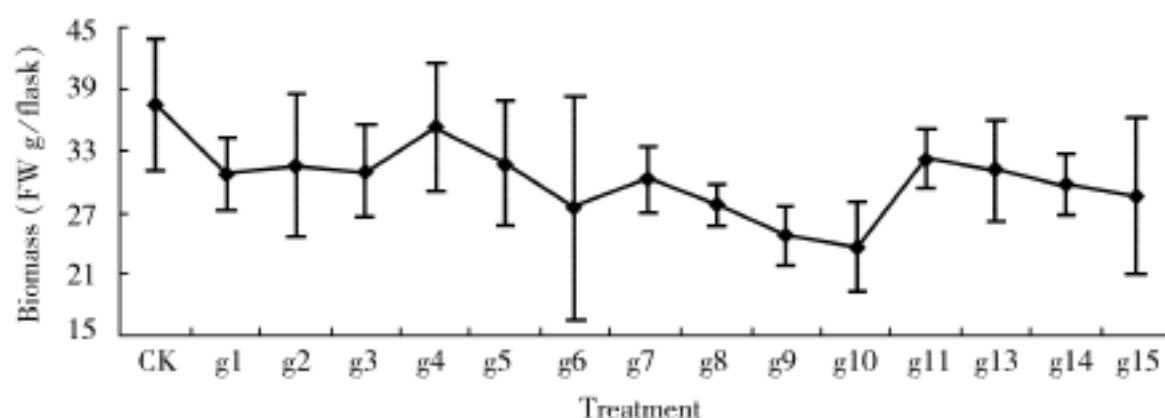


图1 培养30天后真菌诱导子对铁皮石斛原球茎鲜重的影响 CK: 未加诱导子处理的对照; g1-g15: 14种真菌诱导子

Fig. 1 Effect of fungal elicitors on the growth of protocorm in *Dendrobium candidum* 30 days after culture
CK: control without fungal elicitor; g1-g15: 14 types of fungal elicitors

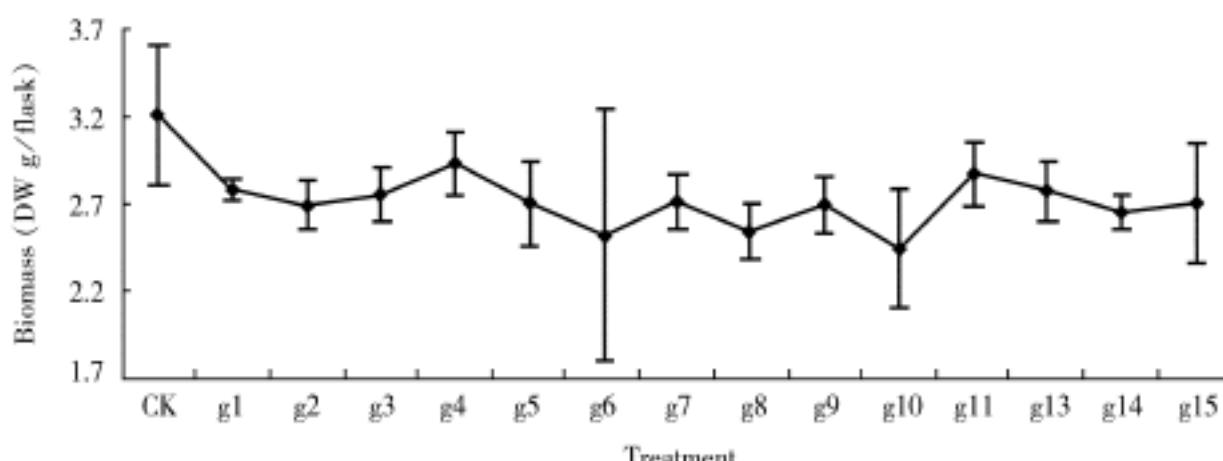


图2 培养30天后真菌诱导子对铁皮石斛原球茎干重的影响 CK: 未加诱导子处理的对照; g1-g15: 14种真菌诱导子

Fig. 2 Effect of fungal elicitors on the growth of protocorm in *Dendrobium candidum* 30 days after culture
CK: control without fungal elicitor; g1-g15: 14 types of fungal elicitors

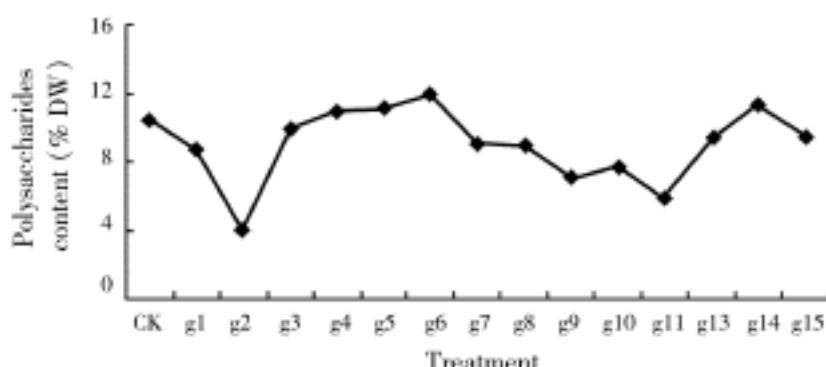


图3 培养30天后真菌诱导子对铁皮石斛原球茎中多糖含量的影响 CK: 未加诱导子处理的对照; g1-g15: 14种真菌诱导子

Fig. 3 Effect of fungal elicitors on polysaccharides content in protocorm of *Dendrobium candidum* 30 days after culture
CK: control without fungal elicitor; g1-g15: 14 types of fungal elicitors

液体悬浮培养的条件不同于固体培养的条件,更不同于自然界附生兰生长的环境。比如,我们已经证实培养在液体和固体培养基上的原球茎在形态上和生理上均不相同(宋经元等,2004)。本研究从对原球茎生长影响的角度,利用正交设计研究了不同浓度的硝态氮和铵态氮对原球茎生物量积累的作用,获得了最佳的浓度配方,对确定生产工艺具有重要的指导意义。结果表明,硝态氮和铵态氮不存在互作,即硝态氮和铵态氮的不同比例对铁皮石斛原球茎生长不具有明显影响,因此在今后的工作中可以对二者分别进行研究。

所选14种真菌及对照对铁皮石斛原球茎生长(鲜重和干重的增加)无显著性影响($P > 0.05$),但与对照相比,14种真菌表现了不同程度的抑制作用。原球茎中多糖含量的分析表明,不同真菌诱导子的影响不同,有的促进多糖产生,有的抑制多糖的产生,为进一步筛选,尚需进行收获样品(干物质)的生物活性研究。

本研究制备诱导子方法简便步骤少,成本低,使用方便。制备获得的真菌诱导子(如g6)明显促进铁皮石斛原球茎培养产生多糖,将有利于在大规模工业化生产中使用。继续研究有两个方向:一是研究此种诱导子的适宜浓度,加入时间与培养物收获时间的最佳组合,为大规模培养工艺提供依据;二是筛选获得有用的诱导子之后,对诱导子制备方法进行改变,以有利于机理研究。

[参考文献]

李春喜,王文林,陈士林,1997.生物统计学[M].北京:科学出

- 版社,48—100
- 南京农业大学主编,1989.田间试验和统计方法(第2版)[M].北京:农业出版社,70—125
- 徐吉民,1987.正交法在医药科研中的应用[M].北京:中国医药科技出版社,20—21,40—41,48—51
- Alexander D, Julia D, Dmitry G, 1996. The role of Ca^{2+} in elicitation of phytoalexin synthesis in cell culture of onion (*Allium cepa L.*) [J]. *Plant Cell Reports*, **15** (12): 945—948
- Benzing DH, 1989. The Mineral Nutrition of Epiphytes [A]. In: Luttege, U Ed. Vascular Plants as Epiphytes: Evolution and Ecophysiology [M]. Berlin: Springer-Verlag, 166—199
- Conceicao LF, Ferreres F, Tavares RM et al., 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum L.* cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation [J]. *Phytochemistry*, **67** (2): 149—155
- Hew CS, Ting SK, Chia TF, 1988. Substrate utilization by *Dendrobium* tissue [J]. *Bot Gazett*, **149** (1): 153—157
- Hew CS, Lim LY, 1989. Mineral uptake by orchid plantlet grown on an agar culture medium [J]. *Soill Cult*, **1** (1): 23—34
- Khosrourshahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A et al., 2006. Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* [J]. *Cell Biology International*, **30** (3): 262—269
- Li MF(李满飞), Xu GJ(徐国钧), Hirata Y(平田义正) et al., 1990. Determination of polysaccharide contents in the drugs of *Dendrobium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), **21** (10): 10—12
- Lim LY, Hew YC, Wong SC et al., 1992. Effects of light intensity, sugar and CO_2 concentrations on growth and mineral uptake of *Dendrobium* plantlets [J]. *J Hort Sci*, **67** (5): 601—611
- Liu XQ(刘晓琴), Zhang W(张卫), Jin MF(金美芳) et al., 2006. Effects of explants, medium formulations and light on callus induction and secondary metabofites accumulated in the cani of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae) [J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **28** (4): 403—409
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM, 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida* [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, **26** (2-4): 252—258
- Sanchez-Sampedro A, Kim HK, Choi YH et al., 2007. Metabolomic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *J Biotechnol* (on line)
- Song JY(宋经元), Guo SX(郭顺星), Xiao PG(肖培根), 2004. Research on suspension culture of protocorm in *Dendrobium candidum* (Orchidaceae) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), **35** (9): 1042—1046
- Yu MJ(郁美娟), Meng QH(孟庆华), Huang DY(黄德音) et al., 2003. Advances in study on active components and pharmacology of *Dendrobium* [J]. *Chin Tradit Patent Med*(中成药), **25** (11): 918—921
- Zhao CF(赵春芳), Yu LJ(余龙江), Liu Z(刘智) et al., 2006. Metabolic profiling analysis of taxanes in *Taxus chinensis* cell cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **28** (4): 557—564